Laboratorio Física Contemporánea II
Facultad de Ciencias
UNAM

Espectro de Absorción de la Clorofila

Resumen: En ésta práctica se le pide al alumno, que en base a un procedimiento químico de extracción de la molécula de la clorofila, esto se hace obteniéndola de los cloroplastos de la hoja de espinaca. Utilizando un espectrofotómetro, se pone en una cubeta de cuarzo una cantidad 0.5 ml de clorofila obtenida y se diluye en 5 ml del solvente utilizado, colocando ésta en en el porta cubeta del espectrofotómetro, después se hace un barrido en el intervalo de 480 a 690 nm en el modo de Absorbancia, obteniendo una gráfica de longitud de onda versus Absorbencia Relativa. Con los picos obtenidos el alumno explicara utilizando Teoría de Orbitales Moleculares, el comportamiento de la de la absorción de la luz por parte de molécula y como ésta libera la energía en diferentes modos.

1. Introducción

La clorofila es una molécula orgánica que está compuesta por pigmentos fotosintéticos cuya estructura esta dada por un tetrapirrol cerrado con varios sustituyentes laterales (Figura 1a). El anillo tetrapirrólico contiene un ión Mg^{2+} en el centro con cuatro nitrógenos de dicho núcleo y un sistema de dobles enlaces conjugados, cuyos electrones son los responsables de la absorción de la radiación del espectro visible. En el anillo IV se encuentra unido el fitol, una cadena hidrocarbonada que forma un enlace éster con un propionilo del anillo. En las plantas existen dos tipos de clorofilas (a y b) que se diferencian en el sustituyente R en el ciclo II del anillo tetrapirrólico (Figura 1). Las clorofilas presentan máximos de absorción en el intervalo de 400 a 700 nm (Figura 1b). Debido a su configuración molecular, la clorofila es una molécula fluorescente que tienen un espectro de absorción y emisión bien definidos; a este tipo de molécula se le conoce como fluoróforo.

Los Carotenoides también están dentro de los cloroplastos y son moléculas hidrocarbonadas de 40 átomos de carbono. Los carotenoides que participan en la fotosíntesis son de dos tipos: tipo caroteno y tipo xantofila. Los carotenoides tipo caroteno constan exclusivamente de carbono e hidrógeno. Los carotenoides tipo xantofila contienen oxígeno además de carbono e hidrógeno. El sistema conjugado de dobles enlaces es el responsable de la absorción de luz en el espectro visible. Su espectro de absorción muestra máximos de absorción entre los 450 nm y 500 nm, correspondientes al azul y al verde (Figura 1b), por lo que la luz roja-anaranjada-amarilla que reflejan les proporciona su color característico.

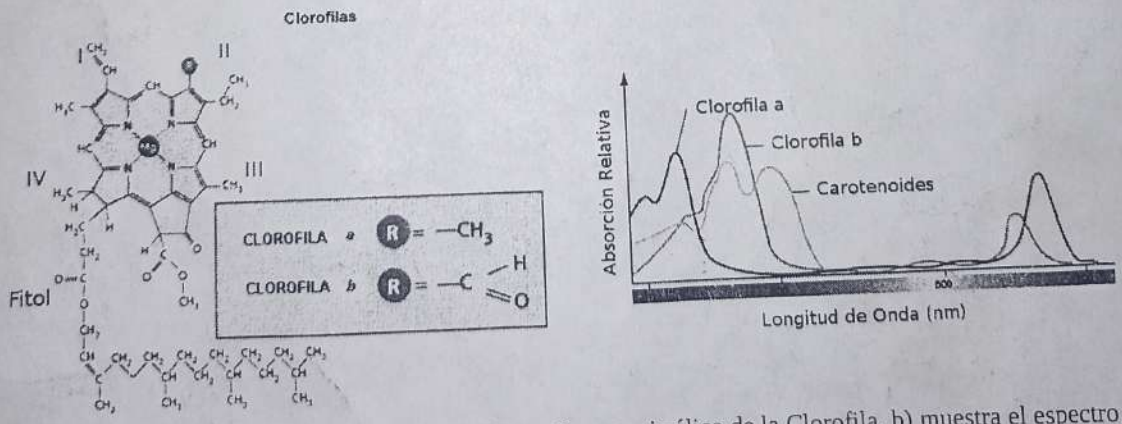


Figura 1. a) Se muestra la estructura molecular de anillo tetrapirrólico de la Clorofila. b) muestra el espectro de absorción para las diferentes moléculas de clorofila.

1. 1 Absorción de la Luz

La luz de ciertas longitudes de onda puede ser selectivamente absorbida por una substancia de acuerdo a su estructura molecular. La absorción de la energía de la luz ocurre cuando un fotón incidente promueve la transición de un electrón de un estado de menor a mayor energía. Las moléculas con electrones en compuestos aromáticos usualmente absorben luz cerca del UV (150–400 nm) o en la zona del visible (400–750 nm). Los electrones excitados eventualmente pierden esta energía ganada y por un proceso de radiación regresan a su estado inicial.

La radiación emitida por una molécula, o un átomo, después de que ha absorbido energía para alcanzar en un estado excitado, es definida como luminiscencia. Ésta se divide formalmente en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. Todos los métodos espectro fotométricos se basan en dos leyes que combinadas se conocen como la ley de Lambert y Beer. La ley de Lambert establece que la fracción de luz absorbida por un medio transparente es independiente de la intensidad de luz incidente, y cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual de la luz pasando a través de él. Lo cual puede ser expresado como:

$\log (I_o / I) = kl$ ....(1)

donde, I_o es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, l es la longitud por donde pasa la luz en la celda del espectrofotómetro y k es la constante del medio. La ley de Beer dice, la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas del cromóforo a través del cual pasa la luz. Lo cual indica que:

$k = \varepsilon c$.....(2)

donde c es la concentración y ε es el coeficiente molar de absorción, una característica propia del cromóforo. ε es igual a la absorción de una solución molar en una celda de 1 cm. Retomado la ecuación de Lambert, obtenemos que:

$\log (I_o / I) = \varepsilon cl$.....(3)

Si consideramos que el término $\log (I_o / I)$ es conocido como absorbancia, por lo que el inverso del cociente entre la luz incidente y la transmitida se le llama transmitancia ($T = I/I_o$), tenemos que:

$A = \log(1/T) = \varepsilon cl$.....(4)

De acuerdo a la ley de Lambert y Beer, la absorbancia debe de ser linealmente proporcional a la concentración del cromóforo.

La longitud de onda y la absorbancia de una molécula no solo dependen de su naturaleza química sino también del ambiente molecular de sus cromóforos. Por lo tanto la espectroscopia es una técnica excelente para seguir las reacciones enzimáticas y transiciones conformacionales en proteínas y ácidos nucléicos. El uso de estas mediciones yace en que no es un método destructivo y no requiere grandes cantidades de muestra.

1.2 Naturaleza de los Estados Excitados

El estado electrónico de una molécula está referido a las propiedades de todos los electrones en todos sus orbitales. La función de onda de un estado electrónico es una combinación de la funciones de onda de cada uno de los electrones en cada uno de los orbitales de la molécula de la cual forman parte.
La forma en que una molécula absorbe radiación electromagnética es por medio de un proceso de excitación, donde la molécula pasa de un estado basal a un estado excitado. En los átomos la absorción involucra la promoción de un electrón de una capa orbital externa hacia un orbital vacío de mayor energía. En moléculas, un electrón es promovido del mayor orbital molecular ocupado (HOMO, highest occupied molecular orbital), al menor orbital molecular desocupado (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital). Cuando un electrón en una molécula es movido de un orbital a otro, cambia el estado de la molécula y entonces es importante considerar los estados de la molécula involucrados en lugar de considerar solamente los orbitales involucrados en la promoción del electrón. Una molécula en un estado excitado es mejor referida como una nueva entidad, solo remotamente relacionada a la misma molécula en estado basal. Un estado excitado tendrá una distribución electrónica completamente diferente del estado basal, una nueva geometría, y más que eso, podrá reaccionar químicamente de forma diferente del estado basal, que es el estado normal o de menor energía.

Existe sólo un estado basal para una molécula dada. Sin embargo, hay diversos estados excitados posibles aún para moléculas muy simples, y la naturaleza exacta de los cuales depende de los tipos de orbitales involucrados. Los estados electrónicos de las moléculas electrónicas se pueden agrupar en dos grandes categorías: estados singulete y triplete.

En el estado excitado singulete, un electrón en un orbital excitado está apareado (espín opuesto) a un segundo electrón en un orbital en el estado basal, dicho de otra forma, todos los electrones en la molécula tienen sus espines apareados. En consecuencia, el regreso al estado basal es "permitido" por el espín y ocurre rápidamente por emisión de un fotón. Este es el caso de la fluorescencia, y las velocidades de emisión de ésta son típicamente de 10^8 s^{-1} , por lo que la vida media de la fluorescencia es cercana a 10 ns.

Los estados excitados triplete son aquellos en los cuales un par de electrones tienen sus espines desapareados, esto es, el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación que un electrón en el estado basal. La fosforescencia es la emisión de luz de estados excitados triplete. La transición al estado basal es impedido y las velocidades de emisión son lentas (10^3 – 10 s^{-1}), tal que la vida media de la fosforescencia es típicamente de milisegundos a segundos.
Aunque la naturaleza exacta de los estados excitados muestra una gran variabilidad dependiente de parámetros específicos para una molécula dada, se pueden considerar algunas moléculas simples para ejemplificarlos. Debido a que tanto la fluorescencia como la fosforescencia ocurren generalmente en moléculas que tienen sistemas de electrones de enlace π , se elige al etileno como un ejemplo simple de dicho sistema. Ya que cada uno de los dos átomos de carbono del etileno involucrados contribuye con dos electrones a los sistemas de orbitales σ y π , el estado basal del etileno es aquel en el cual dos electrones están en el orbital s y dos en el orbital p , quedando vacantes los orbitales σ^* y π^*(Figura 2).

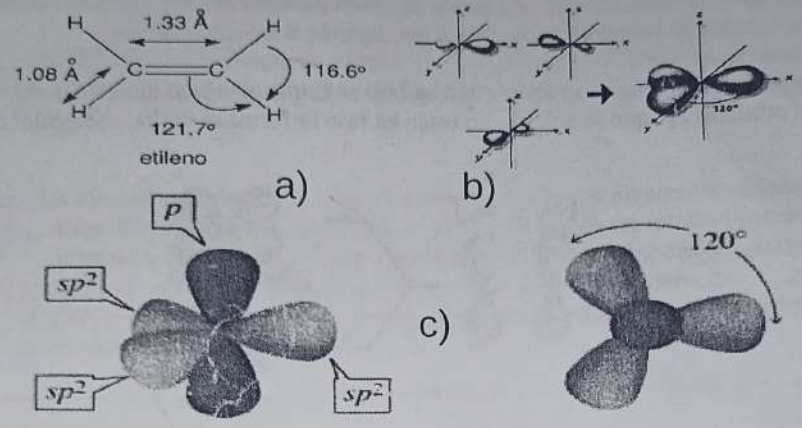


Figura 2. a) Muestra la forma planar de la molécula de etileno, así como el doble enlace en los carbonos. En la figura 2b y 2c, se muestra al carbono ya hibridizado formando niveles sp^2.

El concepto de hibridación también puede explicar la formación de enlaces múltiples en las moléculas orgánicas. Por ejemplo, el etileno, cuya fórmula molecular es C_2H_4, es una molécula plana con una longitud de enlace C-C de 1.33 Å, inferior a la longitud del enlace simple C-C del etano, que es de 1.54 Å. La longitud del enlace C-H en el etileno es de 1.08 Å, también ligeramente menor que el enlace C-H del etano, que es de 1.09 Å. Los ángulos de enlace de C-C-H y H-C-H en el etileno son de 121.7°y 116.6° respectivamente.

Estas distancias y ángulos de enlace se pueden explicar admitiendo que los dos átomos de carbono que forman el enlace C-C de la molécula de etileno presentan una hibridación sp^2. Estos orbitales híbridos se forman por combinación de un orbital 2s con dos orbitales 2p, En este proceso se generan tres orbitales híbridos sp^2 que contienen un 33.33% de carácter s y un 66.66% de carácter p. Los tres orbitales híbridos sp^2 son idénticos y se encuentran en un plano formando un ángulo de 120° entre ellos. El orbital p libre, que no se ha empleado en el proceso de hibridación, se coloca perpendicular al plano que contiene a los tres híbridos sp^2. En la siguiente figura 2 se indica la forma y orientación de los orbitales híbridos sp^2.

Cuando dos átomos de carbono con hibridación sp^2 se solapan frontalmente se forma un enlace sigma σ carbono-carbono, quedando sobre cada átomo de carbono dos orbitales híbridos sp^2 y un orbital 2p no hibridizado. En la molécula de etileno los orbitales híbridos sp^2 que no se han empleado en la construcción del enlace C-C se solapan con los orbitales 1s de cuatro átomos de hidrógeno dando lugar a cuatro enlaces σ Carbono sp^2-Hidrógeno 1s. Sobre cada átomo de carbono queda un orbital 2p, que consta de dos lóbulos a los que se les asigna el signo + y el signo - . Estos signos no representan cargas sino el signo algebraico de la función de onda en las dos regiones o lóbulos que constituyen el orbital atómico p, el solapamiento lateral de dos orbitales atómicos p origina dos orbitales moleculares, uno de carácter enlace π y uno de carácter antienlace π^*. Para que los orbitales 2p se puedan solapar en la molécula de etileno se tienen que orientar paralelamente entre sí y perpendicularmente a la estructura

de los enlaces σ. Para que esto ocurra, la estructura de los enlaces σ tiene que ser coplanar: los seis núcleos atómicos implicados en el enlace de la molécula de etileno tienen que estar situados en el mismo plano. En este caso, los dos orbitales p se sitúan paralelamente y están lo suficientemente cerca para poderse solapar. El solapamiento puede tener lugar de dos formas diferentes:

a) Si los dos orbitales 2p que se solapan están en fase se forma el orbital molecular enlace π.
b) Si los dos orbitales 2p que se solapan no están en fase se forma el orbital molecular antienlace π*.

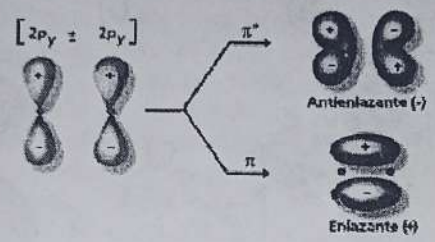


Figura 3. En la siguiente figura se describe la formación de los orbitales moleculares π y π* por interacción entre los dos orbitales atómicos p .

En el estado fundamental de un alqueno, los dos electrones que forman el enlace π entre los átomos de carbono se sitúan en el orbital molecular enlace π. El solapamiento de los orbitales p es menos eficaz que el solapamiento frontal sp^2-sp^2, que forma el enlace σ. Por consiguiente un enlace π es más débil que un enlace σ. La longitud del enlace C-H es menor en el etileno que en el etano por dos razones: Primera, el enlace σ del etileno está formado por el solapamiento de dos orbitales sp^2 del carbono (33.3% de carácter s), mientras que el enlace σ en el etano está formado por el solapamiento de dos orbitales sp^3 (25% de carácter s). Segunda, el solapamiento de los orbitales p que forman el enlace π aproxima a los dos átomos de carbono.

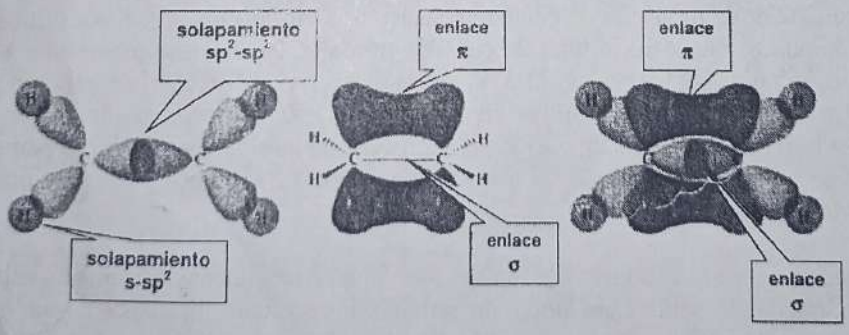


Figura 4. Se indican los tres tipos de enlaces covalentes de la molécula de etileno: un enlace σ (solapamiento Carbono sp^2- Carbono sp^2), un enlace σ (solapamiento Carbono sp^2- Hidrógeno 1s) y el enlace π (solapamiento Carbono p - Carbono p)

1.3 Población de estados excitados

La forma más directa para la promoción de un electrón es que la molécula absorba un fotón de la energía apropiada. La diferencia de energía entre los dos estados corresponderá a la energía del fotón absorbido, $E = hc/\lambda$, donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz en el vacío y λ es la longitud de onda de la luz. A temperatura ambiente, la energía termal no es adecuada para poblar significativamente los estados excitados.

Cada uno de los estados electrónicos, excitado o basal, tiene un número de niveles vibracionales 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Los niveles vibracionales surgen porque una molécula en un estado electrónico puede absorber pequeños incrementos de energía, aunque mantiene la misma configuración electrónica. Los procesos que ocurren entre la absorción y emisión de luz se ilustran usualmente por el diagrama de Jablonski (Figura 5). Existe en una variedad de formas para ilustrar varios procesos moleculares que pueden ocurrir en los estados excitados.

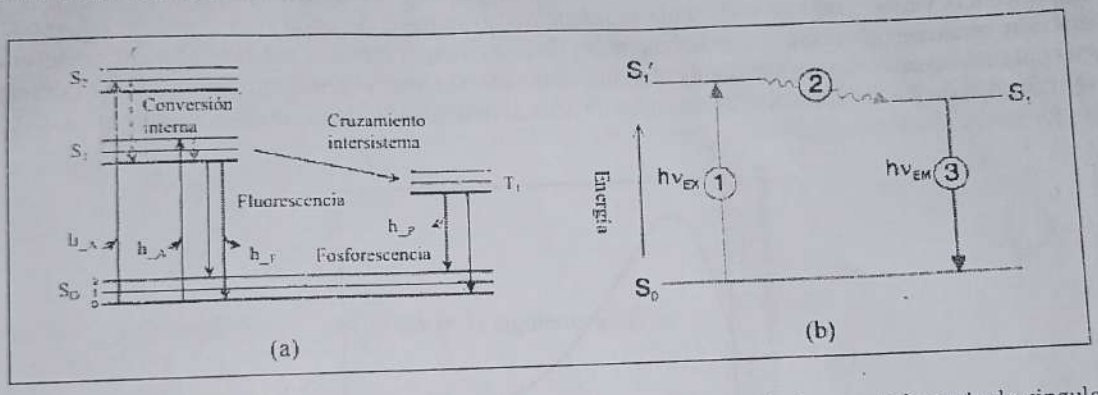


Figura 5. Diagrama de Jablonski. Ilustra el proceso involucrado en la creación de un estado excitado singulete por absorción óptica y subsecuente emisión de fluorescencia. Los estados basales, primer excitado singulete y segundo excitado singulete se representan con S_0, S_1 y S_2, respectivamente. Las transiciones entre los estados se dibujan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz. (a) Las líneas horizontales numeradas denotan los niveles vibracionales. (b). 1: Excitación; 2: Conversión interna 3: Emisión por fluorescencia.

1.4 Fluorescencia

Una vez que una molécula llega al nivel vibracional más bajo de un estado excitado singulete S_1 (0) puede sufrir un proceso que es motivo de nuestro interés. Éste es, que regrese a uno de varios niveles de energía vibracionales/rotacionales del estado S_0 por la emisión de un fotón de luz que corresponde a la diferencia de energía entre el estado excitado S_1, nivel vibracional 0, y un nivel vibracional particular de S_0 . En este proceso radiativo llamado fluorescencia, el electrón en el orbital antienlazante π hace un salto cuántico de regreso al orbital enlazante π^* medio lleno, emitiendo el fotón de luz. El mecanismo puede definirse:

$F^* - F + hv$

siendo F* la molécula fluorescente en estado excitado S_1 (0), y F su estado después de la emisión del fotón, *hv*. El tiempo de vida de un estado singulete excitado es aproximadamente de 10^{-9} a 10^{-7} s y por lo tanto el tiempo de caída de la fluorescencia es del mismo orden de magnitud. La constante de velocidad que se asocia con el proceso radiativo de fluorescencia se define como k_R.

1.5 Espectro de la florescencia

La luz emitida por una molécula a partir de su estado excitado singulete en su nivel vibracional más bajo, S_1 (0), corresponde a la diferencia de energía de éste con un nivel vibracional de S_0. Habrá un espectro de energía de los fotones que fluorescen, y este espectro se presenta en la figura 6. La longitud de onda _ 0 corresponde a la transición radiativa de $S_1(0)$ a $S_0(0)$. Esta es la transición de energía más grande y es la diferencia de energía entre estos dos estados. La longitud de onda corresponde a la intensidad de fluorescencia más alta, la transición de $S_1(0)$ a S_0 (n) representa la transición radiativa más probable entre estos dos estados. Los datos del espectro de fluorescencia se presentan generalmente en un espectro de emisión de fluorescencia, un gráfica de las intensidades de fluorescencia versus longitudes de onda (nanómetros) o número de onda (cm^{-1}). Los espectros de emisión varían ampliamente y son dependientes de la estructura química del fluoróforo y del solvente en cual está disuelto. Los espectros de algunos compuestos, como el perileno, muestran una estructura significativa debida a los niveles de energía vibracional individuales de los estados basal y excitados.

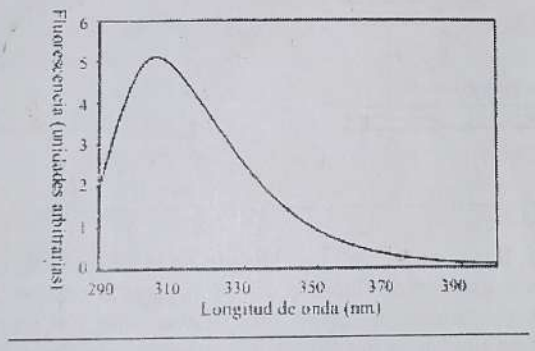


Figura 6. Espectro de fluorescencia típico que representa la distribución de energía de los fotones de $S_1(0)$ a diferentes niveles vibracionales del estado basal, S_0.

2. Método Experimental

2.1 Extracción con etanol

Es importante que los alumnos cuenten con el material de seguridad: Guantes, cubre boca, Bata. El material para realizar la práctica: Una bascula, tubos de ensayo (3), Vasos precipitados (3) diferentes tamaños, dos pipetas de 10 ml, etanol, agua destilada, una parrilla eléctrica, termómetro, soporte universal e hilo cáñamo.

Extraer los pigmentos de cloroplastos de 0.5 g de hojas frescas de espinacas o de cualquier otro material verde cortando las hojas en segmentos de aproximadamente 0.5 cm que se introducen en un tubo de ensayo con 6 ml de etanol al 80% de modo que los segmentos queden bien sumergidos en el etanol. Incubar durante 20 minutos en un baño a 80° para que las clorofilas salgan al exterior y se disuelvan en el etanol. Al cabo de este tiempo los segmentos deberán quedar totalmente decolorados y el etanol queda de color verde.

Para realizar las mediciones, se toman 0.5 ml del sobrenadante de cada uno de los extractos y se diluye hasta 5 ml con etanol al 80% en la extracción con etanol, el resultado de esta mezcla se vacía en una cubeta de cuarzo. También se utilizara otra cubeta de cuarzo donde se vaciará etanol al 80%, ésta se utilizará como referencia para obtener el espectro de absorción. Se coloca en el espectrofotómetro, comenzando a medir desde 480 a 690 nm.

3. Resultados y Discusión

El resultado de la medición se presentan en la siguiente gráfica.

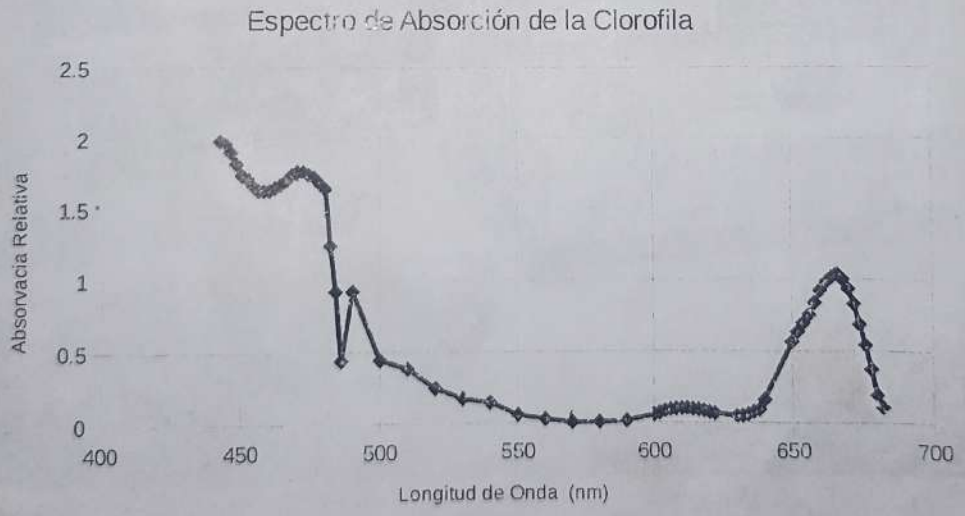


Figura 7. En esta gráfica se debe de analizar que picos corresponde, sí pertenecen a la clorofila a o a la clorofila b.

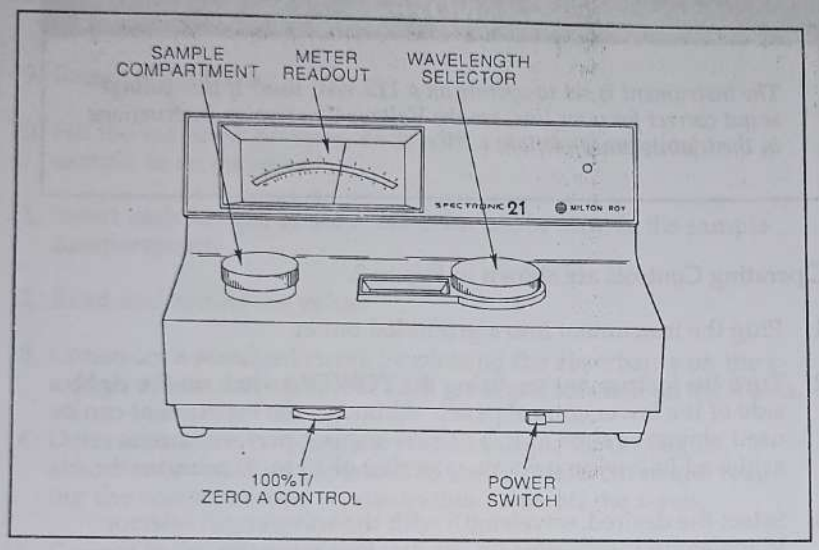


FIGURE 2. SPECTRONIC 21 MV Operating Controls

OPERATING FEATURES

Figure 2 shows the key features of your spectrophotometer.

WAVELENGTH SELECTOR.
This control knob is used to select the desired analytical wavelength of the instrument. The selected wavelength is indicated by the graduated dial to the left of the knob.

100%T/ZERO A CONTROL.
This control is used to set the display to 100%T (0A). **IT MUST BE RESET WHENEVER THE ANALYTICAL WAVELENGTH HAS BEEN CHANGED.** Also, when operating at a fixed wavelength for an extended period of time, check the 100%T readout and readjust if necessary.

METER READOUT.
The 5-1/2" meter, mirrored to prevent parallax error, is linear in transmittance and also calibrated in absorbance. The meter scale reads from 00.0 to 100% transmittance with linear scale divisions at every 1% transmittance. For most analytical purposes absorbance values are more linear than transmittance values and can be more conveniently utilized. An analog output connector permits the use of recording devices to record results in percent transmittance.

NOTE

The instrument is set to operate on a 115 VAC line. If this voltage is not correct for your line, see the Voltage Conversion instructions in the Maintenance section.

Operating Controls are shown in Figure 2.

1. Plug the instrument into a grounded outlet.
2. Turn the instrument on, using the POWER switch on the right side of the lower control panel. Although the instrument can be used almost as soon as it is turned on, best performance is achieved following a warmup period of 15 to 30 minutes.
3. Select the desired wavelength with the wavelength selector. Wavelength is indicated on the dial located to the left of the wavelength selector.
4. Choose matched cuvettes of the appropriate pathlength for the analytical method. Use the same pathlength cuvettes for all blanks, standards, and samples.
5. Open the sample compartment cover.
6. Fill one cuvette with a blank solution and insert it into the sample compartment. Fill the cuvette with enough solution to completely cover the light beam passing through the sample compartment. Milton Roy test tube cuvettes are provided with a horizontal fiducial mark to indicate the proper fill level. A vertical fiducial mark is also provided for alignment with the mark on the sample compartment.

NOTE

a. Solution level must be at least 20 mm high in a standard cuvette (10 mm square; used with cuvette adaptor).

b. Solution level must be at least 32 mm high in a test tube cuvette (used with universal test tube holder).

7. Close the sample compartment cover.
8. Set 000A or 100%T for the blank using the 100%T/zero A control located on the left side of the lower control panel.
9. Remove the blank.
10. Fill the matched cuvettes, each with a standard solution or sample to be measured.
11. Insert each sample or standard solution, in turn, in the sample compartment.
12. Read and record the value.
13. Construct a standard curve by plotting the absorbance on the y-axis vs. the concentration of each standard solution on the x-axis.
14. Determine the concentration of each sample by finding its absorbance value on the y-axis of the standard curve and reading the corresponding concentration value off the x-axis.
15. Correct for any sample blank or interference effects as necessary.

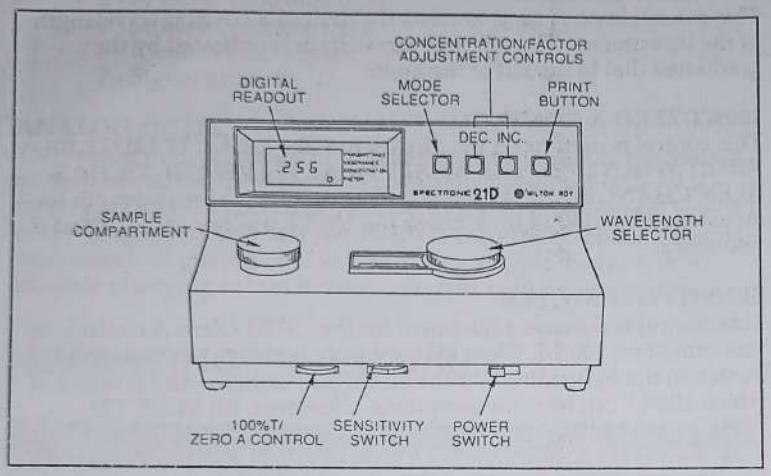
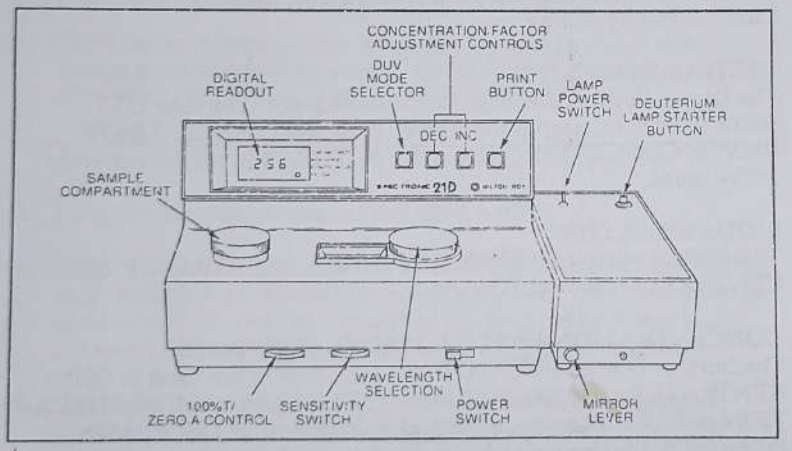
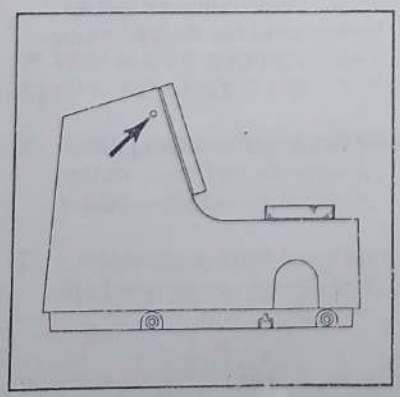


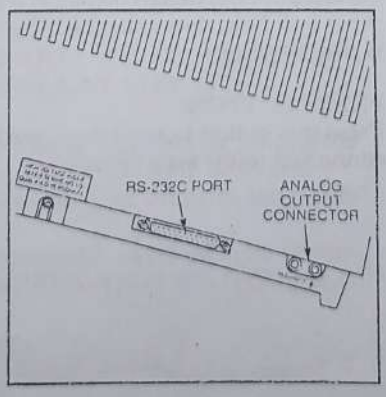
FIGURE 3.
SPECTRONIC 21 DV and DUV Operating Controls

Front View, SPECTRONIC 21 DV



Front View, SPECTRONIC 21 DUV





LEFT: Left side view showing location of calibration adjustment

RIGHT: Back view showing location of RS-232 Port/ Serial Port and Analog Output Connector.

Figure 3 shows the key features of your spectrophotometer.

WAVELENGTH SELECTOR
This control knob is used to select the desired analytical wavelength of the instrument. The selected wavelength is indicated by the graduated dial to the left of the knob.

100%T/ZERO A CONTROL
This control is used to set the display to 100%T (0A). **IT MUST BE RESET WHENEVER THE ANALYTICAL WAVELENGTH HAS BEEN CHANGED.** Also, when operating at a fixed wavelength for an extended period of time, check the 100%T readout and readjust if necessary.

SENSITIVITY SWITCH
This control is a coarse adjustment for the 100%T/Zero A control. If you cannot set 100%T, 0A or 0C on the blank, move the Sensitivity Switch to the M (medium) or the HI (high) position. Any position at which 100%T can be set is acceptable. However, **BE SURE TO RESET THE 100%T/ZERO A CONTROL EACH TIME THAT YOU RESET THE SENSITIVITY SWITCH.** Also, all blank, standard solution, and sample measurements should be made at the same sensitivity setting.

DIGITAL READOUT
The Digital Readout displays the data readings. The four LED status indicators, next to the labels TRANSMITTANCE, ABSORBANCE, CONCENTRATION, and FACTOR, indicate the currently active mode.

MODE SELECTOR
This control selects the TRANSMITTANCE, ABSORBANCE, CONCENTRATION, or FACTOR mode.

CONCENTRATION/FACTOR ADJUST CONTROLS
The buttons labeled INCREASE and DECREASE are used in CONCENTRATION and FACTOR modes. To set a lower CONCENTRATION or FACTOR value, press and hold down the DECREASE button until the desired value is displayed. To set a higher value, press and hold down the INCREASE button until the desired value is displayed.

PRINT BUTTON
Press this button to send displayed data to a printer or computer connected to the serial port.

RS-232C PORT
This is the DB25P connector located on the back of the instrument. The pin functions for this connector are listed below:

1 - Chassis ground.
2 - SPEC 21 transmits data.
3 - SPEC 21 receives data.
5 - Clear to send signal.
7 - Signal ground.

ANALOG OUTPUT
The analog output connector is a double-banana jack outlet located on the back of the instrument. The analog output signal level is factory-set to approximately 1.0 VDC at 100%T. The output is in %T only. This allows you to interface a Y-T recorder to obtain a permanent record of photometric values during sample analysis, or to monitor changing values during time-rate enzyme procedures.

OPERATING PROCEDURES

NOTE

Check the instrument voltage printed on the serial plate. If this voltage is not correct for your line, see the Voltage Conversion instructions in the Maintenance section.

1. Plug the instrument into a grounded outlet.

2. Turn the instrument on, using the POWER switch on the right side of the lower control panel. Although the instrument can be used almost as soon as it is turned on, best performance is achieved following a warmup period of 15 to 30 minutes.

3. Select the desired wavelength with the wavelength selector. Wavelength is indicated on the dial located to the left of the wavelength selector.

IF YOU HAVE A SPECTRONIC 21 DUV, DO ALL REMAINING STEPS. FOR MODEL DV, CONTINUE AT STEP 7.

4. Adjust the mirror position for the lamp required by pulling the mirror lever out when using the deuterium lamp (UV) and pushing the mirror lever in when using the tungsten lamp (VIS).

5. Choose the correct lamp for the selected wavelength by flipping the lamp power switch to TUNGSTEN-VIS or DEUTERIUM-UV.

6. For UV wavelength analyses, ignite the deuterium lamp by pushing the STARTER button for approximately 2 seconds and releasing. The deuterium lamp requires a warm-up of at least 10 minutes before readings are taken. Maximum lamp stability takes longer.

NOTE

The portion of the wavelength dial marked with a red line indicates that the tungsten lamp should be used. The portion of the wavelength dial marked with a blue line indicates that the deuterium lamp should be used. The portion of the wavelength dial marked with alternate red and blue marks indicates that the lamp which provides the most energy (gives the highest %T when no sample is in place) should be used.

7. Choose matched cuvettes of the appropriate pathlength for the analytical method. Use the same pathlength cuvettes for all blanks, standards, and samples.

NOTE

The glass test tubes supplied with the instrument are useable only above 325 nm. Quartz or "fused silica" cuvettes must be used below 325 nm.

8. Open the sample compartment cover.

9. Fill one cuvette with a blank solution and insert it in the sample compartment. Fill the cuvette with enough solution to completely cover the light beam passing through the sample compartment. Milton Roy test tube cuvettes are provided with a horizontal fiducial mark to indicate the proper fill level. A vertical fiducial mark is also provided for alignment with the mark on the sample compartment.

NOTE

a. Solution level must be at least 20 mm high in a standard cuvette (10 mm square; used with cuvette adaptor).

b. Solution level must be at least 32 mm high in a test tube cuvette (used with universal test tube holder).

10. Close the sample compartment cover.

11. Select the operating mode - TRANSMITTANCE, ABSORBANCE, or CONCENTRATION - using the mode selector.

12. Set the SENSITIVITY switch located in the center of the lower control panel to LO.

13. Set 100%T, 000A, or 000C for the blank using the 100%T/zero A control located on the left side of the lower control panel. If there is not enough energy to set 100%T, 000A, or 000C on the blank, move the SENSITIVITY switch to the M (medium) or, if necessary, to the HI position. Be sure to reset the 100%T/zero A control each time that you reset the SENSITIVITY switch.

14. Remove the blank.

15. Fill each of the matched cuvettes with a standard solution or sample to be measured. Then proceed to step 16 under the appropriate heading of the mode you are using.

ABSORBANCE or TRANSMITTANCE MODE

16. Press MODE SELECTOR for the appropriate mode.
17. Construct a standard curve by plotting absorbance/transmittance on the y-axis vs. the concentration of each standard solution on the x-axis.
18. Determine the concentration of each sample by finding its data value on the y-axis and reading the corresponding concentration value off the x-axis.
19. Correct for any sample blank or interference effects as necessary.

CONCENTRATION MODE (to be used only if the linearity of the standard curve has been verified)

16. Press MODE SELECTOR until the CONCENTRATION LED is lit. Place the standard solution in the sample compartment.
17. Using the CONCENTRATION/FACTOR ADJUST controls, set the concentration value of the standard on the digital display. Repeat this step with other standards for verification.
18. Insert samples in the sample compartment and read results directly in concentration units.

NOTE

If the factor is already known for your chemistry, you can enter this value by pressing MODE until the FACTOR LED is lit, and use the CONCENTRATION/FACTOR ADJUST controls to set the display to the desired factor value.

SENDING DATA TO THE SERIAL PORT

Normally, the spectrophotometer is in the print mode when it is first turned on, and operates at a rate of 1200 baud. Other baud rates may be selected when the spectrophotometer is connected to a computer. These rates include 110, 300, 1200, 2400, 4800, and 9600 baud.

If the SPECTRONIC 21 DV or DUV spectrophotometer is turned on while the PRINT button is pressed, the serial port adjusts to the computer's baud rate upon receipt of either the letter E (Enter) or a CR (carriage return) character from the computer.

An external device may send the following commands to the SPECTRONIC 21 DV or DUV spectrophotometer:

P - "Print"
A - Set the data mode to absorbance.
T - Set the data mode to transmittance.
C - Set the data mode to concentration.
F - Set the data mode to factor.

CONTROL-X - Reset spectrophotometer to initial power-up condition.

E (or an ASCII carriage return, CR) - Sets spectrophotometer's baud rate to the rate used by a computer connected to the serial outputpor

DATA FORMAT. (See Table 1. Serial I/O Data Conventions.) Data from the instrument to a printer or other remote device is sent as shown in the following examples:

Photometric Data (three digits, with decimal point)	A, T, C, or F
-01.5	A CR & LF
1.58	A
90.0	T
1.080	C
-.004	C

Table 1. Serial I/O Data Conventions

WORD LENGTH	8 data bits, 1 stop bit. Most significant bit set to 0.
PARITY	None.
ECHO	None.
TERMINATORS	Ignores all carriage returns or line feed characters sent by external device (except for CR in Auto Baud Rate mode). Transmits ASCII CR or LF after every data line.

APPENDIX A
BASIC SPECTROPHOTOMETRY

Spectrophotometry refers to the relative measurement of transmitted light as a function of wavelength. The measurements are relative because the intensity of light transmitted by the sample material (I_S) is related to the intensity of light transmitted by the reference material (I_R) or "blank."

The transmittance, then, is the ratio I_S/I_R. By Beer's Law, the transmittance (T) is inversely related to the concentration (C) of the absorbing species and the pathlength (b) of sample through which the light passes.

$$T = \frac{I_S}{I_R} = 10^{-abc}$$

A.1 WAVELENGTH

The term nanometer (nm = 10^{-9}meters = 10 Angstroms) is the wavelength unit used and is preferred over the older, but equivalent term, millimicron (mμ). A deuterium lamp in the spectrophotometer emits wavelengths in the ultraviolet region, and a tungsten lamp is used for wavelengths in the visible region.

WAVELENGTH regions:
200 to 360 UV
360 to 700 VISIBLE
700 to 1000 near IR

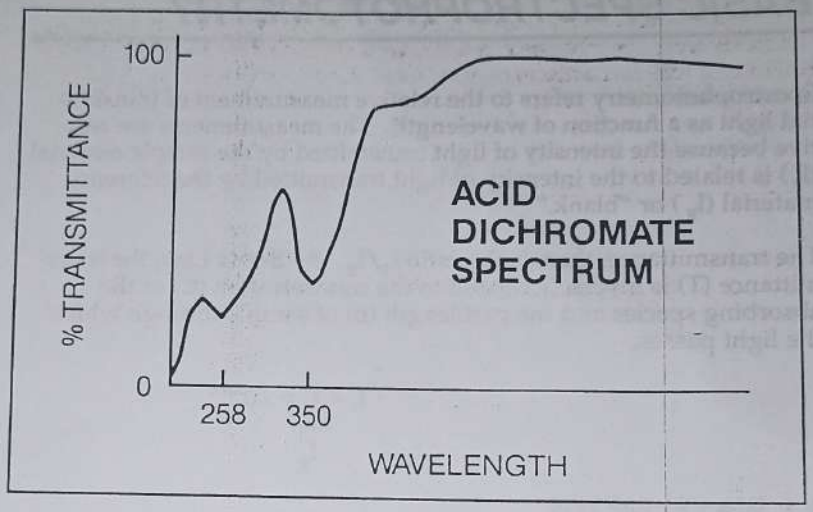
A monochromator is used to isolate from the emission of either lamp, the particular wavelengths required for analytical purposes.

A.2 SPECTRUM

The term "spectrum" refers not only to the range of wavelengths available, but also to the light-absorbing profile of a material as a function of wavelength. Typically, a transmittance minimum is chosen as the analytical wavelength in order to relate the material's light-absorbing properties to its concentration. The transmittance minimum is used both for sensitivity and because many materials are more likely to obey Beer's Law at this wavelength. In the spectrum of dichromate (See Figure A.1), 350 nm is often the analytical wavelength of choice when ultraviolet instrumentation is not

available. If ultraviolet instrumentation is being used, the more sensitive 258 nm peak may be used.

FIGURE A.1
SPECTRUM



A.3 ABSORBANCE

Although the spectrophotometer measures the relative amount of light transmitted, this value is usually converted to absorbance by a table, meter, or electronic conversion to yield results in absorbance ($-\log_{10}T$), which is directly proportional to concentration, and hence, more useful to the operator than transmittance.

$$A = abc$$

This equation holds only for true solutions. Particles in suspension cause an error as they also absorb and scatter light but not in a manner related to Beer's Law.

A.3.1 Absorptivity (a) and Pathlength (b)

The constants (a) and (b) which relate absorbance to the concentration of the absorbing species are pathlength (b) of the solution in the cuvette through which the light passes, and the absorptivity of chemical species (a).

The absorptivity is a physical constant and unique to each chemical species. It is a function of wavelength and is, therefore, usually specified at one or more absorbance maxima (transmittance minima).

When an endpoint analysis is carried out at the wavelength of maximum absorbance, the concentration of the unknown is related to the absorbance by the equation $c = A/ab$, if the absorptivity is known.

A.3.2 Standard Curve

More usually, however, a standard curve is constructed by plotting the measured absorbance of chemical standards on the y-axis versus the known concentrations of those standards on the x-axis. Unknown concentrations are determined from the standard curve by finding the "C" corresponding to the measured A of the unknown.

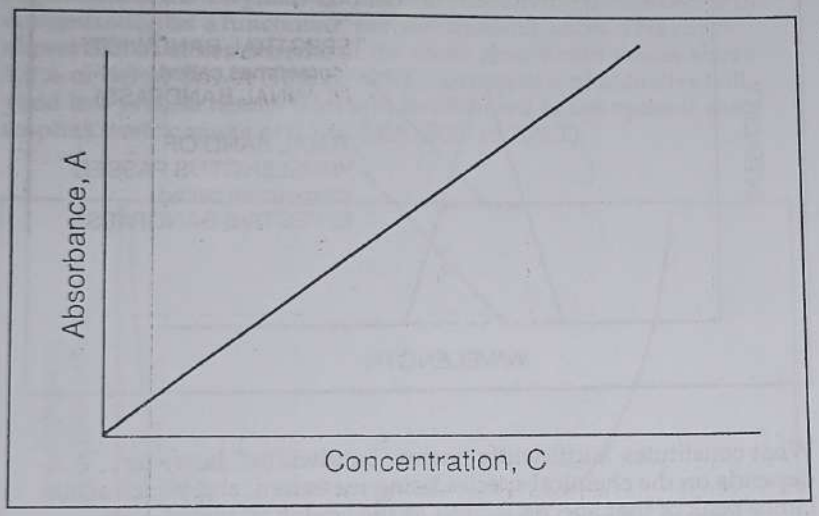


FIGURE A.2
STANDARD CURVE

The standard curve is also a check on the linearity of the chemical method and a check on the validity of Beer's Law for a particular chemical species. Furthermore, if either the absorptivity or the slope of a linear standard curve is known, a multiplier ($^1/ab$) can be used to yield results directly in concentration units on the spectrophotometer.

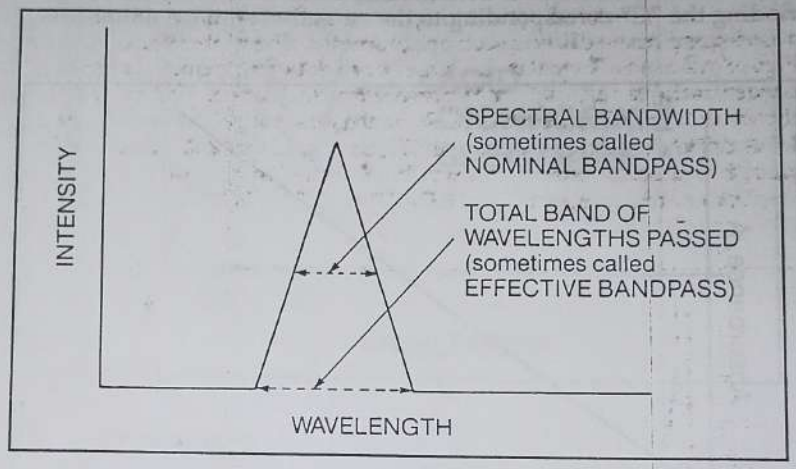
A.3.3 Spectral Bandwidth

The spectral bandwidth or "bandpass" of a spectrophotometer describes the spectral purity of the light passed through the sample. In practice it is not possible to pass a single wavelength, but rather a band of wavelengths. Assuming a triangular distribution of the energy of the light passed, the spectral bandwidth is that wavelength range corresponding to half the peak height. With such a triangular distribution of light, the spectral bandwidth also corresponds to three quarters of the energy passed thru the sample.

As the bandwidth of an instrument decreases, three effects are noticeable on chemical determinations. The number and sharpness of peaks (i.e., resolution) in the spectrum of a chemical species increases down to some bandpass beyond which narrowing the bandpass only increases the noise. Secondly, as the resolution

improves, the wavelength absorbance maximum may shift as the integration of side peaks diminishes. Thirdly, the absorptivity of the chemical species also increases; approaching its maximum value at a sufficiently narrow bandwidth. In practice, this absorptivity increase of a chemical species at narrower instrument bandwidth is responsible for increased sensitivity (slope) of the standard curve.

FIGURE A.3
SPECTRAL BANDWIDTH



What constitutes "sufficiently narrow bandwidth," however, depends on the chemical species being measured, and which absorbance peak of that species is used as the analytical wavelength. Thus, a compound of very narrow natural bandwidth, such as benzene vapor, requires a narrower instrument bandwidth than hemoglobin, for example, to completely resolve the peaks and to obtain the true absorptivity. Hemoglobin, correspondingly, requires a narrower instrument spectral bandwidth than the tungsten blue complex of uric acid which has a wide natural absorbance band.

A.4 ACCURACY

Although the true or limiting absorptivity corresponds to the maximum slope of the standard curve, it is possible to obtain adequate analytical results at an instrument bandwidth which does not fully resolve the peaks or yield the theoretical absorptivity. If a standard curve can be constructed, the sensitivity or slope of the curve is decreased at larger bandwidths, provided the bandwidth is not too large (shown by a non-linear standard curve), unknown sample concentrations can be easily determined from the standard curve. The accuracy of the chemical standards, therefore, determines the accuracy of the analytical result. In enzyme determinations, however, where there are no standards to use for reference, it is far more critical that a bandwidth of 8 nm or less be used so that 6.2 cm^2 /μmole, the true micromolar absorptivity of reduced NAD, be obtained.

A.5 PRECISION

The limiting factor in most chemical methods is the precision of pipetting and the reliability of reagents. In enzyme determinations, temperature fluctuations may also be a source of imprecision. Aside from these considerations, however, precision of spectrophotometric tests can be improved by working in the optimal transmittance/absorbance range of the spectrophotometer. The plot shown in Figure A.4 is the Twyman-Lothian curve showing percent error in concentration as a function of percent transmittance. This curve shows that at either extreme of the scale, absorbance values above 1.0 A or below 0.15 A (10% to 70%T), any spectrophotometer will yield less precise results than will be obtained in the optimal spectrophotometric range of 0.1 to 0.7A (50% to 20%T).

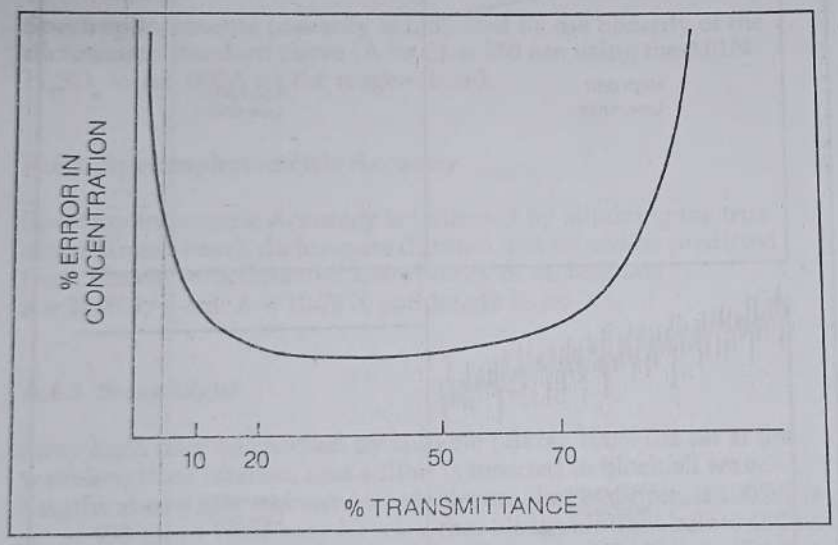


FIGURE A.4
TWYMAN-LOTHIAN CURVE

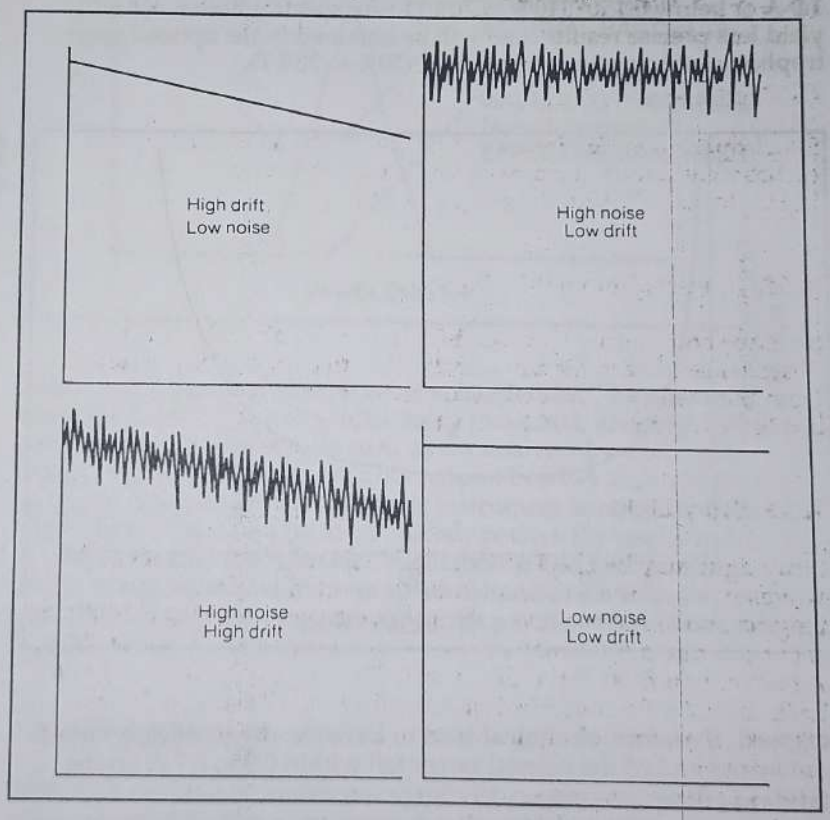
It is well, therefore, in clinical tests to have the diagnostically significant upper end of the normal range fall within 0.3 to 0.7 A on the standard curve.

SPECTRONIC 21

46

Instrument noise (See Figure A.5) is another important factor determining the precision obtained on spectrophotometric assays. Whereas drift refers to a trend in readings over a prolonged period of time, noise refers to the quality of short term stability. Noise is of greater importance than drift in enzyme assays, since each reaction is its own blank. Instrument stability (noise) at the high starting absorbances expected in enzyme tests (and at the wavelength to be used) is a critical factor in evaluation of spectrophotometric instrumentation for enzyme assays. Drift, on the other hand, represents a matter of operator convenience in reducing the frequency of resetting blanks and standards in endpoint testing.

FIGURE A.5
INSTRUMENT NOISE



A.6 CALIBRATION

There are a number of checks that can be performed on a spectrophotometer to verify that it is operating properly. Perhaps one of the most useful checks is careful inspection of a standard curve of a chemical species that is known to obey Beer's Law. Linearity of the standard curve is a good indication of instrument linearity and low stray light levels.

A convenient solution to use for instrument checks is a carefully prepared solution of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) in 0.01N H_2SO_4.

The potassium dichromate should be pure (NBS standard preferred) and dried to constant weight at about 110°C for two to four hours before weighing out 1.0000 gram into a liter volumetric flask. Dilute to volume with 0.01N H_2SO_4. Careful dilutions of this solution may be used to check linearity: dilute 0 (BLANK), 25, 50, 75, 100, 125, 150, and 175 ml of the stock solution each to one liter with 0.01N H_2SO_4. This yields dichromate solutions with concentrations (C) = 0, .025, .050, .075, .125, .150, and .175g/liter, respectively.

A.6.1 Spectrophotometric Linearity

Spectrophotometric Linearity is indicated by the linearity of the dichromate standard curve (A vs C) at 350 nm using the 0.01N H_2SO_4 to set .000A on the reagent blank.

A.6.2 Spectrophotometric Accuracy

Spectrophotometric Accuracy is indicated by obtaining the true absorbance of each dichromate dilution that would be predicted from the well-documented absorptivity of dichromate, a = 10.72 1/g-cm, A = 10.72 X pathlength in cm X c.

A.6.3 Stray Light

Stray light may be checked by suitable filters: 100%T is set at the wavelength of interest, and a filter is inserted to block all wavelengths above this wavelength of interest. For example, if 100%T is set at 400 nm, a filter may be used that blocks all light below 450 nm. A convenient filter is the Corning #3389 for use at 400 nm. (Even a dark solution that absorbs light at 400 nm can be used to block the 400 nm light, providing the solution transmits all light over 450 nm.)

After the filter is inserted, the remaining %T indicates the stray light level. To assure the filter itself is not passing any of the 400 nm light, a duplicate filter may be inserted with the first filter. If all the remaining %T really is stray light, it remains at essentially the same %T reading. If the filter was passing light near 400 nm, the %T reading now drops essentially to zero %T. To test stray light at 340 nm, the Corning #3060 filter is useful.

A.6.4 Wavelength Accuracy

Wavelength accuracy may be checked using a filter with very sharp absorbance peaks. By constructing a point-by-point wavelength plot of %T of the filter (vs 100%T set with an air blank) the wavelengths of minimum %T may be identified. With a 20 nm bandpass, the 585 nm absorbance peak of a didymium filter is useful. For an 8 or 2 nm bandpass instrument, the 360.1 nm peak of a holmium oxide filter is useful. A transmittance minimum (absorbance maximum) should occur at the wavelength mentioned. Because the wavelengths of minimum % transmittance are a function of bandpass, other wavelengths for calibration must be known at the instrument bandpass to be used. Checks of instrument function should always be related back to the performance expected from the instrument specifications.

A.7 BIBLIOGRAPHY

1. Manual on Recommended Practices in Spectrophotometry, American Society of Testing and Material, Committee E-13, THIRD Edition; ASTM, Philadelphia, September 1969.

2. Spectrophotometer Education Manual, Analytical Products Division, Milton Roy Company.

3. Analytical Absorption Spectroscopy, M. G. Mellon, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1950.

4. Effect of Spectral Bandwidth and Wavelength Accuracy on the Measurement of Reduced NAD, Abstract #038, S. Rains, 25th National AACC meeting.

B.1 TRANSMITTANCE MODE

The transmittance mode is useful for calibration; stray light tests; and filter, glass and lens studies. Also, very low concentrations can be measured with greater sensitivity in the transmittance mode. When the transmittance mode is used, the reagent blank is used to set 100%T, and the results for known standards and unknown samples are obtained as percent transmittance. A standard curve may be constructed on semi-logarithmic paper by plotting the percent transmittance on the logarithmic axis versus the concentration of known standards. The best line is drawn through these points. The concentration of unknown samples may then be determined by locating the concentration value which corresponds to the percent transmittance of the unknown on the standard curves.

B.2 ABSORBANCE MODE

Usually, the operator desires results in absorbance for direct correlation to concentration by Beer's Law, Absorbance = absorptivity x path length x concentration (See Appendix A, Basic Spectrophotometry). When the absorbance mode is used, the reagent blank is normally used to set 0 Abs, and the results for known standards and unknown samples are obtained as absorbance. Results in absorbance may be plotted against the concentration of known standards on linear graph paper. The best line is drawn through these points. The concentration of unknown samples may then be determined by locating the concentration value which corresponds to the absorbance of the unknown on the standard curves.

Absorbance measurements are also useful for kinetic studies and for reaction systems which do not obey Beer's Law, and therefore have non-linear standard curves.

B.3 CONCENTRATION MODE

The instrument's digital readout in Concentration mode offers you a more convenient readout, which eliminates the necessity for constructing a standard curve. The instrument electronically converts absorbance data to concentration units by multiplying the absorbance value by a factor (1/ab or dC/dA). Note that the concentration mode may be used only if the linearity of the standard curve has been verified for the test conditions used. These conditions include wavelength, concentration range of interest, cuvette pathlength, and analytical procedure.